

CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Depresión de la síntesis de anticuerpos en la bagazosis experimental

Por la Dra.:

HILDA PAUSTE RUIZ³⁴

Pauste Ruiz, H. *Depresión de la síntesis de anticuerpos en la bagazosis experimental*. Rev Cub Med 18: 1, 1979.

Se produjo bagazosis experimental haciendo inhalar a ratones Swiss una suspensión de polvo de bagazo integral. La bagazosis se acompañó de disminución en el número de células productoras de placas de hemólisis en el bazo, en las respuestas inmunológicas primaria y secundaria contra glóbulos rojos de carnero. La inhalación de polvo de bagazo lavado y esterilizado con rayos gamma no provocó depresión de la respuesta inmunológica.

INTRODUCCION

Algunos trabajadores que manipulan el bagazo de caña padecen de una enfermedad pulmonar llamada bagazosis.¹² Esta enfermedad es producida por la inhalación de las partículas de bagazo. Se han señalado como causas de la bagazosis la reacción a cuerpo extraño, las reacciones de hipersensibilidad, los efectos tóxicos de algunos componentes del bagazo y la infección provocada por los microorganismos que transportan las partículas de bagazo.¹⁵ En general, la inhalación de partículas, sustancias tóxicas, microorganismos y alérgenos del ambiente pueden producir alteraciones transitorias y permanentes del aparato respiratorio y de los mecanismos de defensa del organismo contra agentes agresivos.⁶⁻⁹

En nuestro trabajo, empleando ratones con bagazosis experimental, procedimos a determinar si debido a la bagazosis se afectaba el sistema inmunológico y, en particular, la síntesis de anticuerpos.

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron ratones Swiss hembras de tres a cuatro meses de edad. Una semana antes de iniciar los experimentos, los ratones recibieron tetraciclina por vía oral durante tres días.

Se empleó bagazo integral obtenido en una fábrica de papel y bagazo lavado, suministrado por el ICIDCA, el cual se esterilizó con rayos gamma.

Las partículas de bagazo se tamizaron con una malla de 400 mesh y se prepararon suspensiones de bagazo integral y de bagazo lavado y estéril en solución salina con "tween 80". La suspensión contenía 2 mg de bagazo por ml.³ A los

animales anestesiados con éter se les instiló en las fosas nasales 50 ó 100 microlitros de la suspensión de bagazo, y 50 ó 100 microlitros de salina con "tween 80" a los animales utilizados como testigos. Cada animal recibió dos dosis, con un intervalo de dos días entre ellas.

Respuesta primaria

A) Grupos de 3 a 5 ratones, los cuales recibieron 100 microlitros de suspensión de bagazo integral, junto con sus testigos, se inyectaron con 0,5 ml de una suspensión de glóbulos rojos de carnero (GRC) que contenía 10⁸ glóbulos, por vía intraperitoneal. Unos se inmunizaron el mismo día de la segunda dosis de bagazo; otros, recibieron los glóbulos rojos, a los 7, 13, 17 ó 21 días después. Se determinó al cuarto día de la respuesta inmunológica el número de células esplénicas productoras de placas de hemolisis, utilizando el método de Cunningham.¹⁰

B) En otro grupo los ratones se estimularon con GRC, tres días después de la segunda dosis de 100 microlitros de suspensión de bagazo; y de la misma forma se trataron los animales testigos: se estudió el número de placas de hemolisis producidas por las células del bazo, al tercer, cuarto, quinto, sexto y séptimo días después de inyectados con los GRC.

C) A otro grupo de ratones se les instilaron 50 microlitros de la suspensión de bagazo integral o 50 microlitros de salina. Se inmunizaron a los tres días de la segunda dosis de bagazo o de salina y se sacrificaron al cuarto día de la inmunización.

D) Grupos de animales tratados como los animales del conjunto A pero con suspensión de bagazo lavado y esterilizado con rayos gamma. No se incluyó el grupo inmunizado a los 21 días.

Respuesta secundaria

Se dividieron los ratones en tres grupos de tres animales cada uno. A un grupo se le administró bagazo integral; a otro grupo, bagazo

lavado y estéril; y al tercer grupo, salina. Se inmunizaron con GRC (10⁸ GRC) al tercer día y se restimularon con igual cantidad de glóbulos, doce días después. Al quinto día de restimulados los ratones se determinó el número de células productoras de placas de hemolisis directas e indirectas añadiendo al medio de cultivo suero de conejo anti-IgG de ratón.

Estudio histico de los pulmones

Inmediatamente después de sacrificados los ratones por dislocación cervical se extrajeron los pulmones para su estudio histico. Los pulmones fueron fijados con formol al 10% e incluidos en parafina. Se hicieron cortes de 5 a 6 mieras y se colocaron con hematoxilina y eosina.

Para el estudio estadístico se empleó el *test* de Student en los resultados obtenidos en la respuesta primaria; y en la respuesta secundaria se utilizó análisis de varianza y comparación de medias mediante dúcimas de Duncan.

RESULTADOS

En los animales del grupo A se encontró que el número de placas de hemolisis era significativamente inferior en los animales que recibieron bagazo integral en relación con los testigos (cuadro I). En el estudio histico se demostró en los animales con bagazosis engrosamiento de los tabiques alveolares, zonas con infiltración inflamatoria y granulomas.

En los animales inmunizados, a los tres días de la segunda dosis de 100 microlitros de suspensión de bagazo integral (grupo B) la respuesta de síntesis de anticuerpos se encontró disminuida al tercero y cuarto días después de administrados los GRC. Al quinto, sexto y séptimo días las diferencias entre las respuestas de los animales que recibieron bagazo y las respuestas de los que recibieron sólo salina no fueron estadísticamente significativas (cuadro II). Coincide que sólo se hizo estudio histico de un solo animal tratado con bagazo el sexto día y no se encontraron alteraciones en los pulmones. El séptimo día se hizo estudio histico de dos de los

CUADRO I
NUMERO DE CELULAS PRODUCTORAS DE PLACAS DE HEMOLISIS AL CUARTO DIA DE LA ESTIMULACION CON GLOBULOS ROJOS

Tiempo	Media placas/10 ⁶ células			Media placas/bazo		
	Bagazo			Bagazo		
	Salina	Integral	P<	Salina	Integral	P<
0	1 485	117	0,01	359 810	23 074	0,01
7	1 115	311	0,01	118 184	21 269	0,01
13	706	87	0,05	164 939	15 184	0,05
17	1 138	149	0,01	241 188	28 188	0,05
21	1 614	363	0,05	430 771		

59 874 ón de bagazo o 0,05 a y la

Tiempo: días transcurridos entre la segunda dosis de suspensión y la titulación con los glóbulos rojos de carnero salin es-

CUADRO II
RATONES ESTIMULADOS CON GLOBULOS ROJOS DE CARNERO TRES DIAS DESPUES DE LA SEGUNDA INHALACION DE SUSPENSION DE BAGAZO O DE SALINA

Tiempo	Media placas/ 10 ⁶ células			Media placas/bazo		
	Salina	Bagazo Integral	P<	Salina	Bagazo Integral	P <
3	34	10	0,01	7 381	1 343	0,01
4	622	210	0,01	165 490	30 536	0,01
5	345	297	n.s.	83 910	74 605	n.s.
6	69	78	n.s.	14 400	13 360	n.s.
7	169					

167)s n.s. de la 31 888 33 635 ibulos rojos de

Tiempo: días transcurridos después de la estimulación con carneta ro.

n.s: no significativo.

animales tratados con bagazo; en uno, con respuesta inmunológica deprimida en relación con la de los testigos, se encontró infiltrado inflamatorio en ambos pulmones. En el otro, con un número de placas de hemólisis elevado, no se encontraron lesiones pulmonares. Si se excluyera este animal del grupo de los ratones tratados con bagazo, la media del número de placas de hemólisis sería significativamente más baja que la media de los animales testigos.

La respuesta de los tres ratones del grupo C, a los cuales se les hizo inhalar 50 microlitros de suspensión de bagazo integral, fue también inferior a la respuesta de sus testigos

(cuadro III), tanto en el número de placas por 10⁶ células (p < 0,01), como en el número de placas por bazo (p < 0,05).

No se encontraron diferencias entre los ratones controles y los ratones que recibieron bagazo lavado y esterilizado, salvo el día 7 que se encontró un número significativamente mayor de placas de hemólisis por bazo, pero no por millón de células, en los animales testigos (cuadro IV). La respuesta de estos animales fue también superior a la de algunos testigos de los días restantes, y muy parecida a la respuesta de los ratones tratados con bagazo estéril e in-

CUADRO III

NUMERO DE CELULAS ESPLENICAS FORMADORAS DE PLACAS EN LOS RATONES TRATADOS CON 50 MICROLITROS DE SALINA O 50 MICROLITROS DE SUSPENSION DE BAGAZO INTEGRAL

munizados el día trece. En el examen histico de los pulmones se encontró —en una parte de los animales— alveo- litis menos intensa que en los animales con bagazo integral; un número menor presentó granulomas pequeños y algunos tenían aspecto normal.

En la respuesta secundaria contra los GRC se

<i>Placas/10⁶ células</i>		<i>Placas /bazo</i>	
<i>Salina</i>	<i>Bagazo integral</i>	<i>Salina</i>	<i>Bagazo integral</i>
924	62	166 534	35 100
735	35	136 163	6 533
546	39	120 263	11 694

encontró que no existió diferencia en las características del número de placas de hemolisis de los animales que recibieron bagazo lavado y estéril, y los animales que recibieron sólo salina; y una depresión de aproximadamente cin-

CUADRO IV

NUMERO DE CELULAS PRODUCTORAS DE PLACAS DE HEMOLISIS AL CUARTO DIA DE LA ESTIMULACION CON GLOBULOS ROJOS DE CARNERO

<i>Tiempo</i>	<i>Media placas/10 células</i>			<i>Media placas/bazo</i>		
	<i>Salina</i>	<i>Bagazo lavado estéril</i>	<i>P<</i>	<i>Salina</i>	<i>Bagazo lavado estéril</i>	<i>P<</i>
0	953	803	n.s.	108 662	109 254	n.s.
7	2 028	1 128	n.s.	250 100	203 618	0,05
13	2 155	2 152	n.s.	302 549	493 856	n.s.
17	1 737	2 214	n.s.	305 590		

373 248 n de bagazo o n.s. y la
 Tiempo: < días transcurridos entre la segunda dosis de suspensión
 inyección con los glóbulos rojos de carnero.
 n.s.: no significativo.

CUADRO V

RESPUESTA SECUNDARIA. NUMERO DE CELULAS ESPLENICAS PRODUCTORAS DE ANTICUERPOS HEMOLITICOS DE LA CLASE IgM (DIRECTAS) Y DE ANTICUERPOS DE CLASE IgG (INDIRECTAS)

<i>Tipo de placas de hemolisis</i>	<i>Salina</i>	<i>Bagazo integral</i>	<i>P <</i>	<i>Bagazo lavado estéril</i>	<i>P<</i>
Directas/10 ⁶ células	648	738	0,001	645	n.s.
Directas/bazo	186 589	37 924	0,001	186 590	n.s.
Indirectas/10 ⁶ células	2 922	461	0,001	2 626	n.s.
Indirectas/bazo	836 235	127 601	0,001	746 635	n.s.

n.s.: no significativo.

co veces en los que recibieron las dos dosis de bagazo integral (cuadro V), tanto en el número de placas directas como en el número de placas indirectas.

DISCUSION

No se alteró la respuesta inmunológica de síntesis de anticuerpos con el bagazo esterilizado con rayos gamma para eliminar los microorganismos que pueden causar una infección y lavado para arrastrar parte de las sustancias tóxicas o alergénicas. En los ratones con bagazo- sis causada por el polvo de bagazo integral, la depresión del número de células productoras de anticuerpos podría estar ocasionada por una infección que produjera depresión del sistema inmunológico. La reacción inflamatoria causada por las partículas de bagazo puede contribuir a la disminución de la síntesis de anticuerpos. Se ha informado en diversos trabajos la liberación de sustancias producidas por macrófagos estimulados *in vivo* e *in vitro* que deprimen diferentes funciones de las células linfoides."¹³

Las partículas y las sustancias tóxicas, además de daños morfológicos y funcionales del árbol respiratorio,³⁵ pueden provocar inmunodepresión. Se ha dado a conocer en ratones fumadores, depresión de las respuestas inmunológicas primaria y secundaria^{11,15} y disminución en el consumo de O₂ y de la viabilidad en cultivos de macrófagos tratados con humo o extracto acuoso de cigarrillos.¹⁶

El efecto de la infección sobre el organismo

en general o directamente sobre el sistema inmunológico, la producción de sustancias inmunodepresoras a partir de los macrófagos de las zonas de inflamación, o el efecto tóxico directo sobre las células que intervienen en la síntesis de anticuerpos pueden ser, en conjunto o por separado, responsables de la disminución del número de células productoras de placas de hemolisis encontrado en los ratones que inhalan partículas de bagazo integral.

Es necesario realizar nuevos experimentos para poder determinar si la igualdad en el número de placas de hemolisis al quinto, sexto y séptimo días de la respuesta inmunológica del grupo B se debió a que en estos días se recuperó la capacidad de producir anticuerpos, o sencillamente a que no en todos los animales se produjo la bagazosis, o la enfermedad fue más benigna.

Sería de gran utilidad emplear en nuevos experimentos, polvo de bagazo integral esterilizado, microorganismos aislados a partir de las partículas de bagazo y el líquido de los lavados, para obtener más información acerca de las posibles causas de inmunodepresión.

Agradecimiento

Agradecemos la colaboración de la doctora Tamara Moisés y la de la compañera Caridad Aguilar del departamento de biología celular del CENIC por la realización del estudio histórico de los pulmones. Agradecemos la eficiente labor de la compañera Isabel Cristina Pérez en la ejecución de los experimentos.

SUMMARY

Pauste Ruiz, H. *Depression of antibody synthesis in experimental bagassosis*. Rev Cub Med 18: 1, 1979.

Bagassosis was experimentally induced in Swiss mice by the inhalation of a suspension of integral bagasse dust. Bagassosis was accompanied by a decreased number of hemolysis plate-producing cells in the spleen in the case of primary and secondary immune responses against sheep erythrocytes. The inhalation of washed bagasse dust furtherly sterilized with gamma rays did not induce a depressed immune response.

RÉSUMÉ

Pauste Ruiz, H. *Dépression de la synthèse d'anticorps dans la bagassose expérimentale*. Rev Cub Med 18: 1, 1979.

35 Frost, J. K. et al. Pulmonary cytologic alterations in toxic environmental Inhalation. Hum Pathol 4: ENERO-FEBRERO, 1979

On a provoqué la bagassose expérimentale chez des souris Swiss, lesquels ont inhalé une suspension de poudre de bagasse intégrale. La bagassose a été accompagnée d'une diminution du nombre de cellules productrices de plaques d'hémolyse dans la rate, dans les réponses immunologiques primaire et secondaire contre les globules rouges de mouton. L'inhalation de poudre de bagasse lavé et stérilisé au moyen de rayons gamma n'a pas provoqué de dépression de la réponse immunologique.

PESIOME

**üaycTe Pync, M. Jlenpeccafl cnHTesa anraTeji b 8Kcne-
pHMeHTaJIBHOM óara3oce. Rev Cub Med 18: 1, 1979**

Etiji BH3BaH aKcnepHMeHTajiLHiiñ (5ara30C, flftJiaH HHrajLinxHiD KpucaM Swiss cycneH3nn nopomna HHTerparcbHoro <5ara30 (ot xoah caxapHoro TpoCTKEica). Earasoc coripoBOXiiajiGH norarae- HB6M ROJIHqeCTBa IUieTOK-npOH3BO.HHTeJieS EUic-CTEHOK_reM0JIZ3a b ceJie3efuce Ha nepBFqHHñ 0 BTopiRHHñ HMMYHOJionrqecKHE - OTBeT na Kpacue tnapmçH óapaHa. HHrajLfUDLa nopounta Oara30 npoMHToro h cTepoapa3BpoBaHHoro raMMa ;iywaiiff He BU3Bajio- nenpeccroi MMYHOJioniT?ecKoro oTBeTa.

BIBLIOGRAFIA

1. *Hearn, C. E. D.* Bagassosis: An epidemiological, environmental, and clinical survey. *Br J Ind Med* 25: 267, 1968.
2. *Calviño del Rio, A.; Morales Regalado, E.* Estudio preliminar sobre la bagazosis. *Rev Cub Hig Epid* 15: 51, 1977.
3. *Smetana, H. F. et al.* Experimental bagasse disease of the lung. *Lab Invest* 11: 868, 1962.
4. *Hearn, C. E. D.; Holford-Stevens, V.* Immunological aspects of bagassosis. *Br J Ind Med* 25: 283, 1968.
5. *Salvaggio, J. et al.* Bagassosis IV. Precipitius against extracts of Thermophilic actinomycetes in Patients with bagassosis. *Am J Med* 46: 538, 1969.
6. *Richards, R. J.; Wusteman, F. S.* The effects of silica dust and alveolar macrophages on lung fibroblast grown in vitro. *Life Sci* 14: 355, 1974.
9. *Schorlemmer, H. V. et al.* Macrophages responses to mouldy hay dust, *Micropolyspora faeni* and zymosan, activators of complement by alternative pathway. *Clin Exp Immunol* 27: 198, 1977.
10. *Cunningham, A. J.; Szenberg, A. S.* Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cell. *Immunology* 14: 599, 1968.
11. *Virelizier, J. L.* Mechanism of immunodepression induced by viruses: Possible role of inflected macrophages. *Biomedicine* 22: 255, 1975.
12. *Nelson, D. S.* Production by stimulated macrophages of factors depressing lymphocyte transformation. *Nature* 246: 306, 1973.
13. *Calderón, J.; Unanue, E. R.* Two biological activities regulating cell proliferation found in cultures of peritoneal exúdate cells. *Nature* 253: 359, 1975.
14. *Thomas, W. R. et al.* Effect of cigarette smoking on the humoral immune response of mice. *Nature* 243: 240, 1973.
15. *Thomas, W. R. et al.* Recovery of immune system after cigarette smoking. *Nature* 248: 358, 1974.
16. *York, G. K. et al.* Pulmonary macrophage respiration as affected by cigarette smoke and tobacco extract. *Arch Environ. Health* 27: 96, 1973.